

Artículo para La Prensa Médica en homenaje a la Dra Christiane Dosne Pasqualini

RESISTENCIA CONCOMITANTE ANTITUMORAL: UN POSIBLE MECANISMO DE CONTROL DE LAS METÁSTASIS

Raúl A. Ruggiero

Investigador del Conicet

Laboratorio de Oncología Experimental - IMEX-Conicet

Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires

Introducción

En mayo de 1978, cuando ingresé en la Sección Leucemia Experimental de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires, ciertamente no imaginé que, 39 años después, iba a estar en este mismo sitio trabajando y escribiendo este artículo. Para algunos, tal vez para muchos, la permanencia por un tiempo tan prolongado en un mismo lugar de trabajo es un signo de estancamiento. Se asume tácitamente que el progreso personal está asociado a la competencia y que ésta se plasma en una continua búsqueda de nuevos espacios y expectativas laborales. Aunque esta afirmación puede ser cierta para otras disciplinas o actividades, no pienso que sea pertinente para la investigación científica. Ésta, cuando se trata de una verdadera búsqueda del conocimiento, no se nutre, en mi opinión, de la competencia entre los seres humanos sino, más bien, de la zozobra que nos producen los hechos naturales que no podemos explicar y de la atmósfera de misterio y belleza de la que esos hechos están rodeados. Debo señalar que esta opinión fue sin dudas fortalecida por la influencia que ejerció sobre sus colaboradores y becarios en general, y sobre mí en particular, la Dra. Christiane Dosne Pasqualini.

Recuerdo con claridad el día que la conocí: 10 de mayo de 1978. Yo había terminado hacía pocos días el servicio militar – ya estaba recibido y había pedido prórroga para hacerlo – y un amigo – el Dr. Julio Correa - me pidió que fuera a la Academia de Medicina donde trabajaba, porque quería que continuara su trabajo experimental ya que él había decidido dedicarse a la actividad privada. Allí me presentó a la Dra. Pasqualini, jefa de la Sección. Con su presencia imponente, un lenguaje directo, sin eufemismos y un tono afrancesado que convertía la “erre” en casi una “g” (ella nació en Francia y vivió en Canadá hasta los 22 años) me dijo (sic). “¿Cómo se llama usted? Raúl Ruggiero, le respondí. – Mire Raúl, usted va a trabajar aquí sin cobrar un peso. Pero si dentro de tres o cuatro meses a usted le gusta este trabajo y, especialmente si a mí me gusta usted, tal vez pueda conseguirle una beca.

¿Está de acuerdo? Y... yo venía de cumplir con el servicio militar y de hacerle la venia a sargentos, capitanes y coroneles durante todo un año, así que le respondí (casi haciéndole la venia): - Sí, doctora. – Bien, me contestó, mañana empieza a las 8:30. Buenos días”. Es cierto que el comienzo no parecía muy auspicioso. Pero antes de cumplirse el mes ya me había conseguido una beca de FUNDALEU (Fundación para combatir la leucemia), al año siguiente me presentó al CONICET y así se fue tejiendo la historia.

Desde 1979 a 1985 hice todo el recorrido por las Becas del CONICET: Iniciación, Perfeccionamiento (hoy llamadas becas doctorales tipo I y tipo II) y Formación Superior (hoy llamada beca post-doctoral). En 1982, bajo la dirección de la Dra. Pasqualini, presenté y defendí la tesis *“Inmunopatología por oncornavirus murinos: relación entre inmunodeficiencia y cáncer”*, con la que obtuve el título de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires. En esencia, este estudio procuraba establecer si la teoría de la vigilancia inmunológica enunciada por Thomas y Burnet dos décadas atrás, cumplía un papel importante en las neoplasias inducidas por retrovirus oncogénicos. Esta teoría había ejercido – y aun ejerce – una gran influencia en los estudios destinados a comprender el origen de las neoplasias malignas o cánceres: según ésta, células neoplásicas surgen continuamente en el organismo portando neo-antígenos que el sistema inmune reconoce como no-propios, produciéndose en consecuencia una respuesta inmune que destruye las células tumorales en estado naciente, es decir, antes de que se establezcan como un tumor clínico. Los retrovirus oncogénicos generan tumores, especialmente leucemias, pero a su vez generan inmunodepresión, tanto humoral como celular, en el organismo. Se suponía que esta inmunodepresión eliminaba o atenuaba la postulada vigilancia inmunológica y que esto resultaba una condición necesaria para la aparición de las neoplasias virales. Sin embargo, los resultados de nuestra Tesis demostraron que esta inmunodepresión era perceptible sólo después de que la leucemia se había hecho clínicamente perceptible, con lo cual se relativizaba fuertemente el papel del sistema inmune como agente de control para la aparición de estas neoplasias.

Resistencia Concomitante Anti-tumoral. Descripción del fenómeno

Desde 1982 en adelante, bajo la supervisión de la Dra Pasqualini, y junto con los Dres Oscar Bustuoabad (hoy ya jubilado), Daniel Bonfil (actualmente en la Escuela de Medicina de la Wayne State University de Detroit, USA) y Roberto Meiss, médico patólogo de la Academia de Medicina, una parte considerable de nuestro trabajo estuvo destinada a comprender un oscuro fenómeno de la biología del cáncer denominado *“Resistencia Concomitante Anti-tumoral”* (RC) según el cual un individuo portador de tumor inhibe o retarda el crecimiento de

implantes secundarios de tumor. En ese año (1982) la investigación dominante en oncología estaba asociada al estudio de los entonces recién descubiertos oncogenes celulares (o mejor proto-oncogenes celulares), cuya mutación y/o expresión anómala se suponía que inducían a una célula, hasta ese entonces normal, a evadir los mecanismos de control de la proliferación normal, es decir a convertirse en una célula tumoral. Los oncogenes (o proto-oncogenes) celulares (*c-onc*) estaban presentes en todas las células normales de todos o casi todos los vertebrados. Habían sido descubiertos por su similitud estructural con genes oncogénicos previamente hallados en retrovirus fuertemente transformantes, denominados *v-onc*, demostrándose que los *v-onc* tendrían su origen ancestral en los *c-onc*. El descubrimiento de los oncogenes celulares, llevado a cabo por Bishop y Varmus como una adaptación de la previamente formulada teoría del virogen enunciada por Huebner y Todaro una década antes, les valió a sus autores el Premio Nobel algunos años más tarde. La idea original de que la alteración de un solo oncogén celular podía ser la causa del cáncer fue modificándose con los años para incluir a una miríada de oncogenes trabajando coordinada y secuencialmente entre sí junto con mecanismos que eliminaban simultáneamente la expresión de genes supresores de tumor presentes en las células normales. Pero esta evolución de la teoría de los oncogenes la comentaremos más adelante. En ese año, 1982, la solución, al menos teórica, de la naturaleza y el origen del cáncer, parecía más cerca que nunca. En este contexto, el fenómeno de RC parecía un tema de estudio completamente marginal.

La RC había sido descrita originalmente por Paul Ehrlich en 1906 y, salvo algunos trabajos aislados, entre los que puede mencionarse una breve comunicación de Roffo en Argentina en 1914, el fenómeno permaneció virtualmente olvidado durante casi 60 años hasta que fue re-descubierto por Gershon y otros en la década de los 60'. Aun después de su re-descubrimiento, la RC ha sido relativamente poco estudiada – en comparación con otras áreas de la oncología experimental – a pesar de haber sido descrita en seres humanos y a su posible participación en los mecanismos de control de las metástasis, teniendo en cuenta que éstas son implantes secundarios naturales en un individuo portador de tumor. En este sentido, la experiencia clínica y numerosos datos experimentales han revelado que la extirpación de un tumor puede resultar en un rápido desarrollo de metástasis que no eran aparentes al tiempo de la extirpación, sugiriendo que, en ciertas circunstancias, un tumor primario puede ejercer un control inhibitorio sobre sus metástasis. La RC ha recibido diferentes explicaciones tanto inmunológicas como no-inmunológicas. La hipótesis inmunológica, originalmente propuesta por Bashford en 1908, es soportada por sólida evidencia, basada principalmente en experimentos con tumores murinos (de ratón) fuertemente inmunogénicos inducidos por dosis masivas de carcinógenos químicos o virales. Bashford acuñó el término “*inmunidad concomitante*” para referirse al fenómeno y éste fue el nombre con

el que se lo conoció en el pasado en la creencia de que sólo los tumores inmunogénicos lo exhibían. No obstante, la RC también puede ser inducida por tumores murinos espontáneos de indetectable inmunogenicidad por lo que nosotros propusimos a mediados de los 80' rebautizar el fenómeno como "*resistencia concomitante antitumoral*" (RC), nombre que ha sido aceptado por la comunidad científica. Ahora bien, las hipótesis no- inmunológicas, agrupadas en las teorías de la atrepsis y en la de los factores anti-proliferrativos y/o anti-angiogénicos ofrecen una posible explicación de la RC inducida por tumores no-inmunogénicos pero no explican la inhibición específica de tumores secundarios observada durante el crecimiento de tumores inmunogénicos. En los 14 años que transcurrieron entre 1982 y 1996 estudiamos el fenómeno de RC asociado con el crecimiento de 18 tumores murinos (de ratón) de distinta inmunogenicidad, en un intento de integrar las diferentes hipótesis en un cuadro coherente. Nuestros resultados revelaron que, durante el crecimiento de un tumor primario, pueden ser detectados dos eventos principales y temporalmente separados de RC. El primero es generado sólo por tumores inmunogénicos de pequeño tamaño ($< 500 \text{ mm}^3$), es específico de tumor y timo-dependiente, y la inhibición del implante secundario se asocia a una típica reacción de rechazo inmunológico. Por otro lado, el segundo evento de RC es generado por tumores inmunogénicos y no-inmunogénicos de gran tamaño ($\geq 2.000 \text{ mm}^3$), no es específico de tumor, es timo-independiente, su intensidad es proporcional a la masa del tumor primario y la inhibición del segundo tumor no fue asociada a ninguna reacción inmunológica conocida sino a la presencia de células tumorales vivas en "estado dormido" localizadas en el sitio del implante tumoral. Algunos años atrás, un evento intermedio de RC fue asociado a un muy limitado grupo de tumores de tamaño medio ($1.000\text{-}1.500 \text{ mm}^3$) que restringen el crecimiento del segundo implante tumoral limitando su vascularización. Aunque los mecanismos asociados con el primer evento y el evento intermedio de RC han sido elucidados como dependientes de células T y de angiostatina, respectivamente, la base molecular de la más universal manifestación de la RC, esto es, el segundo evento, permaneció siendo un enigma por muchos años. En estudios llevados a cabo por nuestro grupo de trabajo, se demostró que el segundo evento de RC correlacionaba con la actividad de un factor(es) sérico de bajo peso molecular (no se trataba de anticuerpos ni de factores del complemento) que inhibía *in vitro* e *in vivo* la proliferación de células tumorales. Cuando esta actividad sérica estaba ausente – en nuestra experiencia los únicos casos fueron dos carcinomas de mama altamente metastásicos (denominados C7HI y MM3) – el segundo evento no aparecía, sugiriendo una correlación directa entre el segundo evento de RC [en adelante simplemente RC salvo indicación contraria], la capacidad para restringir el crecimiento metastásico y la presencia de este factor(es) sérico(s). Más aún, metástasis pulmonares producidas por los tumores C7HI y MM3 fueron inhibidas tanto por la presencia concomitante de tumores no relacionados que inducen RC como por la inoculación periódica de suero de

ratones portadores de tumores que generan RC, indicando que, aunque estos tumores no generan RC son muy sensibles a la RC generada por otros tumores. Durante muchos años el origen y la naturaleza química de este factor permaneció elusivo, así como también la paradójica cuestión relativa a por qué tal factor podía inhibir la proliferación de un tumor secundario y no de un tumor primario compuesto por las mismas células.

La saga de la búsqueda del factor sérico anti-tumoral asociado a la RC

Las tareas de purificación y caracterización de este factor anti-tumoral fueron arduas y tortuosas y demandaron casi 20 años de trabajo. En cada paso de la purificación, la presencia del factor era monitoreada por su capacidad para inhibir la proliferación *in vitro* de las células tumorales usando el ensayo de incorporación de timidina tritiada. El proceso de purificación se inició a fines de 1990 con la diálisis del suero de ratones portadores de tumor que inducían RC. Toda la actividad era recuperada en la fracción dializable lo que indicaba un peso molecular de <12.500 Daltons (D). Luego, esa fracción era concentrada por liofilización y sembrada en sendas columnas cromatográficas de Sephadex G-25 (que discrimina pesos moleculares entre 5.000 y 1.000 D) y G-15 (que discrimina pesos moleculares inferiores a 1.500 D). Invariablemente la actividad inhibitoria era encontrada en fracciones inferiores a 1.000 D. Estas fracciones fueron liofilizadas y purificadas una vez más ahora utilizando una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en la cual la elución se hacía con agua en un gradiente de acetonitrilo y ácido trifluoroacético (TFA). En más de 20 experimentos similares realizados a lo largo de los años, la actividad anti-tumoral fue sistemáticamente recuperada en una sola fracción que eluía a una concentración del gradiente correspondiente al 20% de acetonitrilo. Como esta fracción se consideraba suficientemente purificada, a partir de allí, se llevó o se intentó llevar a cabo la caracterización de esta molécula. Hasta aquí el proceso había sido llevado a cabo metódicamente y sin mayores inconvenientes salvo los que demandaron la utilización de un número considerable de animales para obtener cantidades suficientes de suero para el proceso de purificación. Sin embargo en este punto comenzaron los problemas. En el LANAIS-Pro de la Facultad de Bioquímica dirigido por el Dr Santomé, se inició la caracterización del factor utilizando las técnicas de análisis y secuenciación de aminoácidos en la creencia de que se trataba de un pequeño péptido. El primer aminoácido del supuesto péptido resultó ser tirosina; sin embargo, en los siguientes ciclos de degradación, no se obtuvo ningún aminoácido adicional. Este resultado imprevisto indujo a repetir el experimento ante la posibilidad de que hubiera habido algún error. Sin embargo todas las veces que se repitió se obtuvo idéntico resultado. Esto significaba claramente que el factor anti-tumoral no era un péptido aunque la tirosina (que por sí sola, no tenía ningún efecto anti-proliferativo ni contra células normales ni contra células tumorales) podía

participar en su estructura. Pero cuál era la naturaleza química de esa estructura, eso era algo que no podía saberse de acuerdo a las técnicas utilizadas. Era el año 1995 y nos sugirieron que la caracterización de una molécula no-peptídica podía hacerse por resonancia magnética nuclear (RMN) o por espectrometría de masa. Tales técnicas se realizaban en la Facultad de Ciencias Exactas, en Núñez. Nos recibió el Dr. Gross, titular de Química Orgánica, quien, para esos estudios, de acuerdo a sus cálculos, serían necesarios unos 2 litros de material purificado por HPLC. Este requerimiento nos produjo desazón. En efecto, teniendo en cuenta que para obtener 1 ml de ese material purificado, nosotros debíamos partir de 50 ml de suero completo, ello significaba que para obtener 2 litros, debíamos partir de unos 100 litros de suero. Es decir, debíamos obtener suero de al menos 100.000 ratones habida cuenta de que por ratón se obtiene, en el mejor de los casos, 1 ml de suero. Cuando le señalamos la dificultad, el Dr. Gross se limitó a decirnos que esos eran los valores de acuerdo a la sensibilidad de la tecnología de entonces y nos preguntó si no sería conveniente que trasplantáramos nuestros tumores en animales de mayor tamaño para poder obtener más suero por animal. Le agradecemos la sugerencia pero le indicamos que trasplantar tumores de una especie en otra era muy dificultoso y que re-iniciar todo nuestro trabajo en otra especie iba a demandar mucho tiempo. No dijimos nada más pero, teniendo en cuenta la cantidad de suero que necesitábamos, creo que todos pensamos que lo ideal sería inocular los tumores de ratón ¡en uno o dos elefantes o ballenas! aunque la alternativa no parecía muy práctica. Después de este intento fallido, el Dr. Luis Díaz, titular de Química Analítica de la Facultad de Bioquímica se ofreció a tratar de analizar nuestra muestra por RMN pero, como había sugerido el Dr. Gross, el material era muy escaso y lo único que quedó claro era que el material tenía una estructura compatible con tirosina y trazas de ácidos grasos. Pero no pudo determinarse otra cosa. El mismo año (1995) el Dr. Santomé nos puso en contacto con un profesor canadiense, el Dr. Ronald Niece que era conocido de él y que estaba de paso en la Argentina dando cursos de su especialidad, espectrometría de masa y masa en tándem (o masa/masa). El Dr. Niece accedió a llevarse una muestra de nuestro factor para analizarla en su laboratorio de la Universidad de Wisconsin (USA). Sin embargo, aun cuando contaba con aparatos más modernos que en Ciencias Exactas de nuestro país, la cantidad de material era insuficiente para elucidar su naturaleza química. Entre 1995 y 1999 tratamos de reunir toda la cantidad de material que pudimos para aumentar las posibilidades de éxito en la caracterización. Llegamos a extraer suero de alrededor de 3000 ratones portadores de tumor que exhibían RC pero ciertamente estábamos muy lejos de los 100.000 que nos había exigido como mínimo el Dr. Gross. No obstante, esperábamos que la evolución tecnológica nos permitiera el análisis con mucha menos masa. En 1999 nos pusimos en contacto con la empresa Biogen Inc. de Boston que accedió a caracterizarnos el material. Se hizo un acuerdo formal entre la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires y la empresa para

que ésta identificara el factor, que le enviamos por correo como material biológico. Sin embargo nuestras expectativas se vieron otra vez frustradas porque después de 6 meses de espera la respuesta de Biogen Inc. fue que nuestro material no era un péptido (cosa que hacía años ya sabíamos por los estudios del LANAIS-Pro) y que tenía algunos ácidos grasos (cosa que ya nos había indicado el Dr. Díaz en sus estudios de RMN) pero que no tenían la metodología para identificarlos. De ese modo, comenzamos a buscar en Buenos Aires un laboratorio que se encargara de identificar estos ácidos grasos. Tuvimos la fortuna de encontrarlo en 2001 en la cátedra de Biología de la Facultad de Bioquímica que dirigía la Dra. Norma Speziale. Se hicieron análisis de cromatografía en capa delgada y en fase gaseosa y se identificaron al menos tres ácidos grasos –los que estaban en mayor concentración - como palmítico (saturado de 16 carbonos), esteárico (saturado de 18 carbonos) y behénico (saturado de 22 carbonos). Como las prostaglandinas son ácidos grasos no saturados de 20 carbonos, y existía la posibilidad de que estas moléculas estuvieran presentes, aunque en cantidades indetectables por las técnicas utilizadas por la Dra. Speziale, ella nos sugirió que acudiéramos al CEFYBO (Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos) pues allí estaban montadas las técnicas de HPLC para identificar trazas de aquéllas. Nos concentramos en cuatro: las prostaglandinas A1, A2, E2 y J: las A1, A2 y J porque se les había descripto propiedades anti-tumorales; la E2, porque es la más conspicua en los procesos inflamatorios, habida cuenta de que diversos tratamientos anti-inflamatorios reducían la actividad antitumoral presente en el suero de ratones portadores de tumores que inducían RC. Sin embargo, otra vez los resultados fueron negativos. No había la menor traza de ninguna de estas prostaglandinas en la muestra purificada que tenía tan enorme poder anti-tumoral. Corría el año 2003 cuando volvimos a la cátedra de la Dra. Speziale y ella nos dijo que no siguiéramos investigando la presencia de lípidos y ácidos grasos en la muestra hasta tanto no demostráramos que eran significativos para la actividad anti-tumoral. Después de hacer una extracción lipídica con cloroformo, obtuvo dos fracciones, una lipídica que reunía todo el material de esa naturaleza y una fracción acuosa que incluía la tirosina y todo otro material no-lipídico. Al medir el efecto anti-tumoral de las dos fracciones el resultado fue contundente: toda la actividad se concentraba en la fracción acuosa; es decir ácidos grasos y todo otro material lipídico que pudiera haber estado en la muestra, era irrelevante para su acción anti-tumoral. Había que volver a empezar olvidándose de los lípidos. En 2003, a través del Dr. Salvador Bruno, hoy director del Instituto de Investigaciones Hematológicas de la Academia de Medicina, nos entrevistamos con miembros de dos empresas biomédicas europeas con el fin de interesarlos en la identificación de este factor anti-tumoral. En ambos casos, después de leer nuestro informe, demostraron mucho interés, pero no en la tarea de caracterizar el factor sino en la de comercializarlo una vez que lo hubiéramos identificado. Volvimos a nuestro peregrinaje y entre 2003 y 2005, evaluamos la eventual presencia de

un sinnúmero de moléculas de bajo peso molecular con potencial anti-tumoral que podrían haber estado presentes en la fracción acuosa de la muestra. De este modo analizamos la posible presencia de las poliaminas espermina, espermidina y putrescina (con la colaboración del Dr. Pablo Hockl en el IBYME, Instituto de Biología y Medicina Experimental), de urea, ácido úrico y creatinina (en el laboratorio de Análisis Clínicos del Dr. Sergio Nosseto), ácido urocánico (en nuestro laboratorio de la Academia de Medicina), etc. Invariablemente, en todos los casos, los resultados fueron negativos: ninguna de estas moléculas pudo ser detectada en la muestra purificada. En el año 2005, el LANAIS-Pro nos informó que había adquirido un espectrómetro de masa y de masa en tándem (masa/masa) de atrapamiento iónico de última generación y que con sólo 50 o 100 microlitros de la muestra purificada sería posible averiguar la naturaleza química del factor anti-tumoral. Habían pasado 10 años y la técnica de espectrometría había aumentado su sensibilidad en varios órdenes de magnitud: cuando en 1995 se requerían 2 litros, ahora sólo eran necesarios 50 o 100 microlitros: un aumento de sensibilidad del orden de 20 mil a 40 mil veces. Entusiasmados con la idea de que, después de 15 años, íbamos a conocer finalmente la estructura del factor anti-tumoral, llevamos la muestra al laboratorio donde las Dras. Susana Linskens y Evangelina Dacci, discípulas del ya jubilado Dr. Santomé, se ocuparon del experimento. El resultado fue sorprendente: en un amplio rango entre 0 y 2000 D - que era donde se concentraba la actividad anti-tumoral - sólo aparecía un pico conspicuo correspondiente al peso molecular de la tirosina sumado al protón que se incorpora en el espectrómetro: 182 D. Aparte de ese pico había otros picos enormemente más pequeños pero ninguno de ellos se reprodujo en los 10 ensayos idénticos que realizamos. Parecía que habíamos llegado a un callejón sin salida. No era posible que la muestra con tan enorme poder anti-tumoral estuviera compuesta sólo por tirosina que carecía por completo de ese poder. Debía haber algún error, pero, ¿cuál era? Una posibilidad era que la molécula de tirosina estuviera unida químicamente a otra estructura, que esa combinación fuera la que detentaba todo el poder anti-tumoral y que la unión entre ambas moléculas fuera bastante lábil y no soportara las condiciones de análisis en el interior del espectrómetro. Esta alternativa tenía dos graves inconvenientes: en primer lugar el factor anti-tumoral había probado ser muy resistente al calor ($>100^{\circ}\text{C}$), ácido (al menos hasta pH 3) y álcali (al menos hasta pH 11) y a adversas condiciones de extracción; no parecía muy probable que se degradara en las suaves condiciones en que trabaja un espectrómetro de atrapamiento iónico; en segundo lugar, si esa misteriosa molécula unida a la tirosina existía, ¿por qué no aparecía como un pico conspicuo, en el lugar correspondiente a su peso molecular, como aparecía la tirosina en el lugar correspondiente al suyo? La Dra. Linskens nos sugirió otra alternativa. Hasta ese momento, habíamos utilizado el espectrómetro en su forma positiva, es decir que cada molécula era detectada por su habilidad para incorporar un protón. La mayoría de las moléculas biológicas son detectadas de esta forma

pero hay algunas que no captan protones sino más bien tienen tendencia a liberarse de ellos. Para detectar tales moléculas se usa el espectrómetro de masa en su forma negativa. Esa debía ser la solución; la elusiva molécula debía ser incapaz de incorporar un protón por eso no había sido hasta entonces detectada. Sin embargo, cuando se usó en su forma negativa, el espectrómetro no reveló la presencia de ninguna molécula por sobre el ruido del aparato. Si realmente existía algo más que tirosina en la muestra, parecía tratarse de una molécula que era indetectable por las técnicas más sofisticadas de detección. Los muchos experimentos de espectrometría de masa se realizaron entre 2005 y 2007 y todos dieron el mismo resultado. Desalentada, a fines de 2007, la Dra Evangelina Dacci, que junto con Susana Linskens, habían participado de todos nuestros experimentos hechos en el LANAIS-Pro desde 1991, me dijo: "pensar que ya me estoy por jubilar y no hemos podido descubrir qué es esta sustancia". Esas palabras oficiaron de acicate para mí que, ya en el laboratorio, comencé a buscar todos los trabajos posibles en los que se hablara o se nombrara la palabra "tirosina". Uno llamó particularmente mi atención. Se trataba de un trabajo de botánica donde se estudiaban los mecanismos por los cuales los pastos compiten y desplazan malezas en su vecindad como una estrategia de crecimiento. Se hablaba de que ciertos pastos no usan quinonas sino una sustancia que no había sido identificada hasta ese entonces y que los autores, a través de procedimientos casi idénticos a los que nosotros habíamos empleado para nuestra muestra, identificaron como meta-tirosina, un isómero de la tirosina, con el oxidrilo del anillo en posición 3 en vez de 4. Los autores señalaban que meta-tirosina tenía un poderoso efecto citotóxico sobre células de malezas *in vivo*, proponiéndola como una nueva y menos dañina forma de controlar malezas. Lo interesante de este planteo es que nos daba una clave para entender nuestra muestra: probablemente lo que siempre tuvimos a nuestra vista era meta-tirosina y no tirosina, dado que el peso molecular de ambas es idéntico. Todos los isómeros de tirosina tienen el mismo peso molecular y por lo tanto son indistinguibles por espectrometría de masa, pero son distinguibles por espectrometría de masa en tándem (o masa/masa). Esta técnica está diseñada para fragmentar moléculas y los fragmentos en que se disocian los distintos isómeros son peculiares de cada isómero. Se hizo el análisis de nuestra muestra por espectrometría de masa en tándem y el resultado sólo reveló la presencia de ¡tirosina! Volví a leer el trabajo de botánica y otro de química analítica donde se separaban los distintos isómeros de tirosina utilizando HPLC. Pero, a diferencia del HPLC que habíamos empleado siempre de rutina y que involucraba un gradiente de TFA en acetonitrilo, éste tenía un gradiente de TFA en metanol. En estas condiciones nuevas, la fracción con alto poder anti-tumoral se separó en tres sub-fracciones o picos que identificamos utilizando marcadores estándar: el primero y más conspicuo, correspondía a tirosina; el segundo correspondía a meta-tirosina y el tercero a orto-tirosina (el isómero con el grupo oxidrilo en posición 2 en el anillo). De manera que nuestra muestra con poder anti-tumoral

era en realidad una mezcla de tirosina y sus dos isómeros en una proporción cercana a 10:1, lo cual explicaba por qué la muestra no-fraccionada analizada por espectrometría de masa en tándem parecía contener sólo tirosina. El exceso de ésta ocultaba la presencia de sus isómeros. Pero ahora éstos habían sido detectados y analizando su efecto biológico sobre la proliferación tumoral *in vitro*, pudimos demostrar que tanto meta- como orto-tirosina tenían poder antitumoral aunque el efecto de meta-tirosina era unas 10 veces más robusto que el de orto-tirosina. ¡Habíamos finalmente logrado identificar las moléculas responsables del segundo y más universal evento de RC! Era el año 2009. ¡Habían pasado 19 años desde que habíamos comenzado el proceso de purificación!

Efectos antitumorales de meta-tirosina y orto-tirosina. RC inducida por tumores humanos

A partir del descubrimiento de los isómeros de tirosina, el progreso fue relativamente rápido. Después de demostrar que ambos isómeros tenían una poderosa actividad anti-tumoral *in vitro* se demostró que la fenilalanina y en menor medida, ácido glutámico, ácido aspártico, glutamina e histidina, pero no tirosina ni ninguno de los restantes aminoácidos, inhibían o contrarrestaban el efecto anti-tumoral de meta- y orto-tirosina *in vitro*. Se ensayó luego su efecto *in vivo* demostrándose que cuando se inoculaba meta-tirosina y en menor medida orto-tirosina en el sitio de un implante tumoral éste no crecía. Recíprocamente, cuando se inoculaba fenilalanina en el sitio de un implante secundario, éste, que no debía crecer por RC, comenzaba a hacerlo, lo cual indicaba fuertemente que el fenómeno de RC *in vivo* estaba mediado por meta- y orto-tirosina. Paralelamente, demostramos que el sitio del tumor primario exhibe una gran concentración de aminoácidos, incluidos aquéllos que contrarrestan el efecto de meta- y orto-tirosina, mientras que el sitio de un implante secundario exhibe una concentración mucho menor. Esto permitió ofrecer una explicación plausible de por qué un tumor primario sigue creciendo mientras que un tumor secundario es inhibido, paradoja central de la RC que había permanecido sin resolver durante más de un siglo. También demostramos que, al menos en parte, meta- y orto-tirosina son el resultado de la oxidación de fenilalanina circulante producida por especies reactivas del oxígeno liberadas por células mieloides inmaduras activadas.

Después de demostrar la existencia de RC en tumores murinos, el siguiente paso fue determinar si el fenómeno también era producido por tumores humanos. Para llevar a cabo estos experimentos trasplantamos líneas de tumores humanos en ratones *nude* que, por ser genéticamente inmunodeficientes, permiten el crecimiento de tumores xenogéneos. En las tres líneas tumorales estudiadas – un carcinoma nasofaríngeo denominado KB

-, un carcinoma de pulmón – denominado Calu-6 – y un carcinoma de próstata avanzado – llamado PC3 - se verificó una inhibición del tumor secundario en presencia de un tumor primario que crecía en el flanco contra-lateral. Esta inhibición fue paralelamente más intensa a medida que el tumor primario era progresivamente más grande. Es decir, los tres tumores humanos generaban RC y ésta era enteramente similar a la RC generada por tumores de ratón (en rigor enteramente similar al segundo y más universal evento de RC generado por tumores murinos), no sólo porque en ambos modelos la intensidad de la RC es proporcional a la masa del tumor primario sino porque en ambos la naturaleza de la inhibición del tumor secundario fue análoga. En efecto, en los dos modelos, el segundo implante permanecía viable pero en estado de tumor “dormido” y el análisis del ciclo celular reveló dos puntos de detención: uno en fase G1 y el otro en el interior de la fase S. De igual modo, en los modelos humanos, como también había sido reportado previamente en los modelos murinos, la inhibición del tumor secundario fue revertida por la inoculación *in situ* de fenilalanina (un aminoácido que contrarresta el efecto inhibitorio de meta-tirosina y orto-tirosina) sugiriendo que el fenómeno de RC inducida por tumores humanos también sería mediado, al menos en parte, por meta- y/o orto-tirosina. Esta posibilidad fue fortalecida poco después con la demostración de que los sueros de ratones *nude* que albergaban tumores humanos exhibían una actividad antitumoral cuya intensidad era proporcional a la masa del tumor primario y a la RC que éste generaba y que, al menos en el modelo humano que se estudió con más detalle (el carcinoma de próstata PC3) esta actividad antitumoral podía atribuirse a meta- y orto-tirosina circulantes.

Potencial anti-metastásico de meta-tirosina y orto-tirosina

El paso siguiente fue evaluar el efecto de ambos isómeros sobre el crecimiento de metástasis establecidas, el principal problema clínico del cáncer. Se eligieron en primer lugar tres tumores de ratón, dos que habíamos estudiado extensamente en nuestro laboratorio (los carcinomas de mama C7HI y MM3) y un tercero (el carcinoma mamario 4T1) que nos cedió amablemente el Dr. Zwirner del IBYME.

En todos los casos, los ratones portadores de tumor fueron divididos en dos grupos al momento de iniciarse el tratamiento: el grupo experimental recibió una inoculación diaria endovenosa de meta-tirosina u orto-tirosina (se evaluaron tres dosis de 3,3; 33 y 67 mg/kg) mientras que el otro grupo recibió solución fisiológica o nada. El tratamiento fue, en todos los casos, iniciado al tiempo en que las metástasis ya se habían implantado en pulmón e hígado, lo cual se sabía por experimentos previos y también, en forma más directa, por el análisis de un grupo de ratones sacrificados al tiempo de iniciar el tratamiento.

Se llevaron a cabo dos estrategias experimentales: en una, los ratones permanecieron con su tumor subcutáneo no tocado; en la otra, los tumores fueron extirpados quirúrgicamente al tiempo de iniciar el tratamiento. Se demostró que la administración periódica, durante tres semanas, de las tres dosis de meta y orto--tirosina reducía significativamente el número de metástasis pulmonares y hepáticas de los ratones portadores de los tres tumores ensayados, aunque los efectos fueron más significativos con las dosis mayores de meta-tirosina.

En los experimentos donde el tratamiento se inició después de haber extirpado el tumor subcutáneo (aquí se usó sólo el tumor MM3 porque era el que daba metástasis más tempranas es decir, cuando el tumor primario subcutáneo era de tamaño moderado y podía ser extirpado con relativa facilidad sin el peligro de recidivas locales), los resultados fueron más dramáticos aún. En efecto, se observó que, mientras todos los controles no tratados y operados (100%; 9 de 9) morían rápidamente en el mes y medio siguiente a la operación (media \pm error estándar = 41 ± 6 días) con un altísimo número de metástasis pulmonares y hepáticas, los dos grupos experimentales tratados con orto-tirosina y meta-tirosina (67 mg/kg/día durante 45 días empezando un día después de la operación) exhibieron una significativa inhibición de las metástasis. Entre ambos el efecto fue mucho más pronunciado cuando se usó meta-tirosina. En efecto, el tratamiento con orto-tirosina duplicó la sobrevivencia de los ratones controles (media \pm error estándar = 85 ± 19 días, $p < 0.02$) pero en definitiva todos (5 de 5) terminaron muriendo. En contraste, sólo un 25% (2 de 8) de los ratones tratados con meta-tirosina murió (las muertes se produjeron a los 56 y 104 días), mientras que los seis restantes permanecieron vivos durante todo el lapso de la vida normal de un ratón (alrededor de dos años), sin que se pudieran detectar metástasis al tiempo de su muerte ($p < 0.002$ respecto del grupo control).

Este resultado altamente promisorio nos estimuló a evaluar el poder terapéutico de meta-tirosina sobre metástasis de tumores humanos (para estos experimentos usamos sólo meta-tirosina porque de los dos isómeros es el que tiene mayor efecto). El problema metodológico es que los tumores humanos no suelen producir metástasis espontáneamente en ratones *nude*. Intentamos salvar esta dificultad a través de dos estrategias: 1) En primer lugar utilizamos "metástasis experimentales" inoculando células tumorales por vía endovenosa. En esas condiciones se logran obtener focos de crecimiento tumoral en el pulmón que pueden ser estudiados. El tratamiento de ratones con metástasis experimentales de un tumor de próstata humano fueron reducidas por un factor de 10 o más y mientras todos los ratones no tratados (grupo control) murieron entre 30 y 40 días después del inóculo endovenoso con gran número de metástasis pulmonares, entre el 40-50% de los ratones tratados permanecieron vivos durante todo el lapso de la vida normal de un ratón. 2) En segundo lugar

utilizamos tumores humanos creciendo en ratones *SCID* - que exhiben una inmunodeficiencia aun mayor que la de los ratones *nude* – en los cuales algunos tumores humanos generan metástasis espontáneamente. Cuando ensayamos el efecto de meta-tirosina sobre las metástasis espontáneas producidas por un carcinoma de mama humano creciendo en estos ratones, observamos una significativa reducción de las metástasis al cabo de tres semanas de tratamiento. En el futuro intentaremos demostrar este efecto sobre metástasis de otros tumores humanos así como sobre tumores de ratón de otra estirpe histológica, por ejemplo melanomas.

Ensayos de toxicidad y mecanismos moleculares

Los resultados anteriores cobran mayor significado comoquiera que hasta hoy no hemos podido detectar ningún efecto tóxico colateral como consecuencia de la inoculación periódica de meta- y orto-tirosina aun cuando se probaron dosis hasta 20 veces superiores a las dosis terapéuticas. En el futuro deberíamos poder demostrar esta ausencia de toxicidad en otras especies aparte del ratón, por ejemplo, en ratas y conejos, antes de que pueda eventualmente probarse en seres humanos.

Estimulados por los resultados obtenidos comenzamos a investigar los mecanismos moleculares asociados al efecto antitumoral de estos isómeros. En primer lugar nos dedicamos a meta-tirosina dado su mayor efecto antitumoral. Este estudio, realizado en colaboración con las Dras. Elba Vázquez y Geraldine Gueron de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA) se llevó a cabo en paralelo utilizando células de un tumor murino y de un tumor humano y hasta hoy los resultados fueron similares en ambos modelos. En primer lugar, evaluamos los efectos de meta-tirosina sobre la actividad del transductor de señales y activador de la transcripción STAT3 y del activador de transcripción NF- κ B ya que ambos son constitutivamente activados en muchos tumores avanzados. Se demostró que meta-tirosina inhibe fuertemente tanto la expresión y la localización nuclear de STAT3 activado (pSTAT3) como la actividad transcripcional de NF- κ B. Para detectar la inhibición de NF- κ B se usó un constructo reportero que contenía cinco repeticiones de una secuencia que permitía la unión de NF- κ B posicionadas antes de (upstream) el gen de la luciferasa (pNF- κ B-luc). Más aun, la adición de fenilalanina revierte parcialmente la inhibición producida por meta-tirosina aunque la fenilalanina sola no produce ninguna alteración en la actividad del STAT3 ni en la del reportero usado para detectar NF- κ B.

En el paso siguiente, evaluamos por RT-qPCR la expresión de un blanco (downstream target) de STAT3, a saber, survivina, y pudimos confirmar que la expresión de survivina estaba marcadamente reducida en las células incubadas con meta-tirosina y este efecto era también restaurado por

fenilalanina. Más aun, la activación constitutiva de STAT3/ NF- κ B puede regular la vía de señalización de Notch que parece cumplir un papel clave en una variedad de cánceres, sobrevida, proliferación, maduración y mantenimiento de células madre (*stem cells*) De allí que hicimos un estudio de posibles blancos moleculares de la vía *Notch* y nuestros resultados revelaron que la exposición a meta-tirosina producía una marcada reducción de los niveles de mRNA para *HES1*.

Trabajos previos han demostrado que la inhibición de STAT3 induce signos de autofagia. Más aun, se ha mostrado asimismo que meta-tirosina puede ser incorporada en proteínas de eucariotas utilizando el tRNA de la fenilalanina. Sobre la base de esto, nosotros postulamos que una elevada incorporación de meta-tirosina en proteínas no sólo puede llevar a alteraciones funcionales que limiten la proliferación celular (por ejemplo si meta-tirosina es incorporada en lugar de fenilalanina en la ADN polimerasa) sino que también puede inducir la activación de autofagia. Confirmando esta suposición previa, las células tumorales incubadas en presencia de meta-tirosina exhibieron una significativa acumulación de LC3-II - un marcador del fenómeno autofágico – mientras que la adición de fenilalanina contrarrestaba ese efecto. También examinamos si, en presencia de meta-tirosina, los auto-fagosomas estaban fusionándose con lisosomas en auto-fagolisosomas, para lo cual agregamos bafilomicina A1. La bafilomicina A1 impide la fusión entre auto-fagosomas y lisosomas impidiendo a su vez la degradación de LC3-II. Nuestros resultados demostraron claramente que LC3-II se acumulaba en las células PC3 en presencia de meta-tirosina y bafilomicina A1, sugiriendo fuertemente que meta-tirosina inducía la formación de auto-fagosomas y que la vía autofágica era funcional.

Muchos estudios serán necesarios para elucidar por completo los mecanismos moleculares que subyacen el efecto antitumoral de los isómeros de tirosina así como también para evaluar cuáles son los alcances y las posibilidades terapéuticas reales de estos isómeros.

¿Qué resultará de todas estas investigaciones? ¿Tendrán meta-y orto-tirosina alguna aplicación terapéutica en tumores en seres humanos como la tiene en tumores de ratón o en líneas de tumores humanos creciendo en ratones *nude* y *SCID*? Aunque espero que así sea, debo decir que realmente no lo sé. Sólo el tiempo y nuevos experimentos lo podrán decidir.

Palabras finales

Dicen que veinte años no es nada. Pero treinta y nueve años (los que llevo trabajando en la Academia Nacional de Medicina) creo que ya comienzan a ser algo. Cuando miro hacia atrás a veces me sorprende comprobar la gran cantidad de personas a quienes debo agradecer su generosa ayuda. Entre

todas ellas, aparte de la Dra Pasqualini, sobresale nítidamente la imagen noble, inteligente y extraordinariamente generosa de dos personas –ya fallecidas - Juan Portaluppi y Antonio Morales, jefe y sub-jefe técnicos y pilares de la Sección por casi 50 años.

Como ya indiqué arriba, el trabajo sobre el fenómeno de RC comenzó en los 80' del siglo pasado. Lo que no dije es que en esa década, cuando se iniciaron estas investigaciones, y en parte de la década siguiente, durante las cuales la Dra Pasqualini fue la jefa de la Sección Leucemia Experimental (hoy Oncología Experimental) antes de ocupar su sitio como primera mujer académica de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires, esa Sección fue el lugar más agradable para trabajar que uno pudiera imaginarse.

Éramos unas 25 o 30 personas entre investigadores, becarios y personal técnico. La mayoría de los investigadores éramos muy jóvenes pero llegamos a publicar en las mejores revistas de oncología de la época. Y además, había entre todos, un clima de gran compañerismo y amistad y una disposición a colaborar desinteresadamente que, desafortunadamente, no he visto casi en ningún otro lado.

Y debajo de esa trama estaba, sosteniéndolo todo, la Dra Christiane D. Pasqualini. Ella nos estimulaba permanentemente a trabajar sin descanso, a escribir, a presentar comunicaciones en congresos y a publicar. Y, lo más importante, nos estimulaba a pensar libremente, no ateniéndonos a los dogmas, a las cosas establecidas, tratando siempre de ir más allá de lo obvio. Y todo lo hacía sin un ápice de nostalgia por tiempos idos y mejores. Y eso que ella había trabajado con los *mejores*: en Canadá, con Hans Selye, el mago del Stress; y aquí en Argentina, fue becaria de Houssay y compartió el laboratorio con Leloir, Braun Menéndez, el Dr. Pasqualini (que luego sería su esposo), Foglia, Lanari, etc. No, ella siempre miraba hacia el futuro, siempre con entusiasmo, procurando que sintiéramos su alegría por ese tiempo lleno de trabajo y esperanzas, en el que lo nuevo y lo desconocido siempre parecían al alcance de la mano.

Tal vez nada ejemplifique mejor su prédica que estas palabras de Albert Einstein que ella tenía sobre su escritorio: “Lo más hermoso de la vida – decía Einstein – es lo insondable, lo que está lleno de misterio. Ese es el sentimiento básico que se encuentra junto a la cuna del arte verdadero y de la auténtica ciencia. El que no lo experimenta así, el que no es capaz de asombrarse o de admirar está como muerto por decirlo así y con la mirada apagada”.

Por eso, todos los que fuimos discípulos directos de ella (y mi generación fue la última en serlo) podemos decir, sin duda, (tomando prestada una dedicatoria de Carl Sagan) que en medio de la vastedad del espacio y de la inmensidad del tiempo, fue muy grato compartir un planeta y una época con Christiane.

TRABAJOS MÁS RELEVANTES DE NUESTRO GRUPO SOBRE EL FENÓMENO DE RC

Ruggiero RA, Bustuoabad OD, Bonfil RD, Meiss RP, Pasqualini CD. "Concomitant immunity" in murine tumours of non-detectable immunogenicity. *Br. J. Cancer* 51: 37-48, 1985.

Meiss RP, Bonfil RD, **Ruggiero RA**, Pasqualini CD. Histological aspects of concomitant resistance induced by nonimmunogenic murine tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 76: 1163-1175, 1986.

Bonfil RD, **Ruggiero RA**, Bustuoabad OD, Meiss RP, Pasqualini CD. Role of concomitant resistance in the development of murine lung metastases. *Int. J. Cancer* 41: 415-422, 1988.

Sordelli DO, Fontan PA, Meiss RP, **Ruggiero RA**, Bustuoabad OD. Counter-irritation and anti-inflammation inhibit the growth of a tumor of non-detectable immunogenicity. *Br.J. Cancer* 60: 734-738, 1989.

Ruggiero RA, Bustuoabad OD, Cramer P, Bonfil RD, Pasqualini CD. Correlation between seric antitumor activity and concomitant resistance in mice bearing non-immunogenic tumors. *Cancer Res.* 50: 7159-7165, 1990.

Franco M, Bustuoabad OD, di Gianni PD, Goldman A, Pasqualini CD, **Ruggiero RA**. A serum-mediated mechanism for concomitant resistance shared by immunogenic and non-immunogenic murine tumours. *Br. J. Cancer* 74: 178-186, 1996.

Ruggiero RA, Bruzzo J, Chiarella P, di Gianni P, Isturiz MA, Linskens S, Speziale N, Meiss RP, Bustuoabad OD, Pasqualini CD. Tyrosine isomers mediate the classical phenomenon of concomitant tumor resistance. *Cancer Res* 71: 7113-7124, 2011.

Ruggiero RA, Bruzzo J, Chiarella P, , Bustuoabad OD, Meiss RP, Pasqualini CD. Concomitant tumor resistance: the role of tyrosine isomers in the mechanisms of metastases control. *Cancer Res* 72: 1043-1050, 2012.

Chiarella P, Bruzzo J, Meiss RP, **Ruggiero RA**. Concomitant tumor resistance. *Cancer Letters* 324: 133-141, 2012.



**ÚLTIMA FOTO DE LA DRA. CHRISTIANE D. PASQUALINI EN
“SU” SECCIÓN DE ONCOLOGÍA EXPERIMENTAL CON EL AUTOR
DEL ARTÍCULO A SU LADO A LA IZQUIERDA DE LA FOTO**